



Please Click here to view the drawing

Korean FullDoc

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020010006792 A
(43)Date of publication of application: 26.01.2001

(21)Application number: 1020000012606

(71)Applicant: LIFENZA CO., LTD.

(22)Date of filing: 08.03.2000

(72)Inventor: HUH, SU JIN
KIM, DO MAN
KIM, DO WON
RYU, SU JIN(51)Int. Cl A61K 7 /28

(54) ENZYME LYSING PLAQUE, MICROORGANISM PRODUCING IT ALSO, COMPOSITION COMPRISING THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: An enzyme lysing plaque, a microorganism producing the enzyme and a composition comprising the enzyme are provided. The enzyme concurrently exhibits the amylase activity and dextranase activity and the composition is effective in a prophylaxis of the formation of the plaque and tooth decay. CONSTITUTION: The enzyme DXAMase lysing a dextran, a starch and an insolubility glucan is isolated from *Lipomyces starkeyi* (L. starkeyi) ATCC 74054 or mutant thereof L. starkeyi KSM 22 (deposited in deposit No.

KFCC-11077). The insolubility glucan is one of major polysaccharide ingredient of the plaque and results in a formation of the tooth decay. The DXAMase shows two 94 K and 60 K bands on SDS-PAGE gel (10 %), and pl value of two bands is 6.00. The composition for oral comprises one of the DXAMases having molecular weights of 94 K and 60 K.

COPYRIGHT 2001 KIPO

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. A61K 7/28	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2002년10월25일 10-0358376 2002년10월11일
(21) 출원번호 (22) 출원일자	10-2000-0012606 2000년03월08일	(65) 공개번호 (43) 공개일자 특2001-0006792 2001년01월26일
(30) 우선권주장 (73) 특허권자	1019990007809 1999년03월06일 대한민국(KR) 주식회사 라이프엔자 대한민국 135-856 서울 강남구 도곡2동 467-10 우성리빙텔 506호	
(72) 발명자	김도만 대한민국 500-820 광주 북구 문흥2동 787번지 6호 우성아파트 103동 902호 김도원 대한민국 704-917 대구 달서구 성당2동 565-3 허수진 대한민국 503-330 광주광역시남구진월동대주아파트202동1409호 류수진 대한민국 500-042 광주광역시북구중흥2동329-7번지	
(74) 대리인	박장원	
(77) 심사청구	심사관: 원호준	
(54) 출원명	플라크를 분해하는 효소, 그것을 생산하는 미생물 및 그효소를 함유하는 조성물	

요약

본 발명은 본 발명의 목적은 플라크 형성을 억제하거나 플라크를 분해하는 효소, 그것을 생산하는 방법, 그것을 함유하는 조성물 및 그것을 생산하는 미생물에 관한 것이다.

대표도

도6

백인어

플라크 억제, 텍사메이즈, 충치억제

경세서

도면의 간단한 설명

도 1a는 텍사메이즈의 아밀레이즈 pH 특성 그래프이다.

도 1b는 텍사메이즈의 덱스트라네이즈 pH 특성 그래프이다.

도 2a는 텍사메이즈의 아밀레이즈 온도 특성 그래프이다.

도 2b는 텍사메이즈의 덱스트라네이즈 온도 특성 그래프이다.

도 3은 텍사메이즈의 레반 분해능을 나타내는 TLC 결과이다

도 4는 텍사메이즈의 세포 응집 억제능을 나타내는 그래프이다.

도 5는 텍사메이즈의 플라크 형성 억제능을 나타내는 그래프이다.

도 6은 텍사메이즈의 플라크 제거능을 나타내는 그래프이다.

도 7은 구강세정제 내에서의 글루칸 형성 억제능을 나타내는 그래프이다.

도 8은 구강세정제 내에서의 글루칸 제거능을 나타내는 그래프이다.

도 9는 구강세정제 내에서 텍사메이즈의 안정성을 나타내는 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 플라크 형성을 효과적으로 억제시킬 수 있고 플라크를 분해시킬 수 있는 효소, 그것을 생산하는 미생물 및 그것을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

치아 표면에 형성되는 막(플라크)는 치밀하게 팩킹된 세균과 비 세포성 물질로 이루어진다. 플라크의 주요 폴리사카라이드 성분은 물에 녹지 않는 글루칸(불용성 글루칸) 또는 유텐(mutan)으로, 플라크 건조총량의 약 20%를 차지하며, 충치를 유발시키는 주요 원인 중 하나이다.

Streptococcus mutans

에 의해 생산되는 글루칸의 구조 연구를 통해 불용성 글루칸은 주로 알파-1,3, 알파-1,4-알파-1,6-D-글루코사이드 결합으로 이루어진다는 것이 보고되었다. 따라서 플라크를 효과적으로 제거하기 위해서는 유텐 분해 활성, 전분 분해 활성 및 덱스트란 분해활성이 필요하다.

종래에는 플라크 형성이나 충치를 억제하기 위한 방법으로

Streptococcus mutans

이하,

S. mutans

의 성장을 억제하는 방법이 제시되었으며, 이를 위하여

S. mutans

성장을 억제하는 항생물질이나 불소와 같은 화합물을 치약이나 구강세정제와 같은 구강용 제품에 포함시켜 사용하는 것이 제시되었다. 대표적인 항충치용 화합물로 사용되는 불소는 충치 유발균의 성장을 억제하는 효과는 있으나 매우 낮은 농도에서도 반상치(치아의 에나멜질에 흰반점 기 생기는 현상), 강한 독성과 대기오염 등의 부작용이 심하다. 덱스트라네이즈와 같은 효소로도 충치 억제를 시도하고 있으나 그 효과는 아직 불분명하다.

미국특허 5,741,773에는 항플라크 및 항충치 활성이 있는 글라이코매크로펩타이드를 함유하는 치약 조성물을 제공하였다.

이러한 종래기술은 모두 충치 유발균의 성장을 억제하는 것에 관련된 것으로, 플라크의 형성 억제나 이미 형성된 플라크 분해는 제시하지 못하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 플라크 형성을 억제하거나 플라크를 분해하는 효소를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 플라크 형성을 억제하거나 플라크를 분해하는 효소를 생산하는 미생물을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 플라크 형성을 억제하거나 플라크를 분해하는 효소의 생산방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 플라크 제거 및 충치 억제 효과가 뛰어난 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

Lipomyces starkeyi

(이하

L. starkeyi

)는 덱스트란을 분해하는 엔도-덱스트라네이즈(EC 3.2.1.11)과 전분을 분해하는 알파-아밀레이즈를 생산한다고 보고되었다. 이 미생물은 식품에 응용되고 있으며 항생물질이나 기타 독성 물질을 생산한다는 보고는 없다.

몇몇 세균성 덱스트라네이즈를 제외하고는 미생물에 의해 생산되는 덱스트라네이즈는 일반적으로 유도성 효소로 알려져 있다. 본 발명자는 덱스트라네이즈 및 아밀레이즈 모두를 항상 생산하는

L. starkeyi

ATCC 74054를 보고한 바 있으며(미국특허 5,229,277), 이 미생물이 생산하는 효소의 특성을 밝히면서 슈크로오스 및/또는 전분을 사용하여 작은 크기의 덱스트란을 생산하는 것을 보고하였다.

본 발명은 플라크의 형성을 억제하거나 플라크를 분해할 수 있는 효소에 관한 것이다.

본 발명의 효소는 덱스트란과 전분을 분해할 뿐 아니라 불용성 글루칸을 분해하는 효소로, 이하 본 발명의 효소를 덱사메이즈(DXAMase)라 한다

본 발명에 따른 덱사메이즈는 덱스트란을 기질로 사용하였을 때 주로 글루코오스, 아이소말토오스 및 분지 사탄당을 생산하고, 이외에 분지 5탄당 및 분지 육탄당을 소량 생산한다. 전분을 기질로 하였을 때는 주로 글루코오스, 말토오스, 말토트리오스, 말토테트라오스를 생산하며, 이외에 다양한 말토올리고당을 생산한다.

본 발명에 따른 덱사메이즈는 β -플락탄의 폴리머인 레반(levan)을 분해할 수 있으므로 플라크 형성 성분인 프락탄(fructan)도 효과적으로 분해할 수 있다.

따라서 본 발명에 따른 덱사메이즈는 수용성 글루칸과 불용성 글루칸을 모두 효과적으로 분해한다. 또한 글루칸과 세균의 응집을 저해함으로써 플라크 형성을 억제하거나 형성된 플라크를 제거할 수 있으므로, 충치 예방에 효과적이다.

치아의 구성 성분과 유사한 하이드록시아파테이트를 이용하여 실험한 결과, 덱사메이즈는

2. funiculosum

덱스트라네이즈에 비해 하이드록시아파테이트에 대한 결합력을 우수하였으며, 따라서 덱사메이즈가 치아에 잔존 능력이 우수할 것으로 추측된다.

본 발명에 따른 덱사메이즈는 다양한 구강세정제에서 안정할 뿐 아니라, 현재 치주질환 치료제로 사용되는 클로로헥시딘(chlorohexidine)에 의해서도 효소 활성이 저해되지 않는다.

덱사메이즈는

2. starkeyi

ATCC 74054 또는

2. starkeyi

KSM 22로부터 분리할 수 있다. 즉,

2. starkeyi

ATCC 74054 또는

2. starkeyi

KSM 22를 배양한 배양액으로부터 분리되며, SDS-PAGE(10%)에서 94K, 60K 두 밴드로 나타나며, 두 밴드 모두 pI값은 6.0이다.

또한 본 발명은 덱사메이즈를 생산하는 신규한 미생물에 관한 것이다. 본 발에 따른

2. starkeyi

KSM 22는

2. starkeyi

ATCC 74054를 돌연변이시켜 얻었으며,

2. starkeyi

ATCC 74054보다 덱사메이즈 생산성이 우수하다. 본 발명 균주

2. starkeyi

KSM 22은 1999년 1월 19일자로 대한민국 서울시 서대문구 신촌동 134번지에 위치한 사단법인 한국중균협회(KFCC)에 기탁하였으며 기탁번호 KFCC-11077를 부여받았다.

또한 본 발명은 텍사메이즈를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은

L. starkeyi

ATCC 74054 또는

L. starkeyi

KSM 22를 배양하고 배양액으로부터 텍사메이즈를 회수하는 것으로 이루어진다.

L. starkeyi

ATCC 74054 및

L. starkeyi

KSM 22는 모두, 가격이 비싼 덱스트란 뿐 아니라 글루코오스, 플라토오스, 설탕 또는 전분 등을 이용하여 텍사메이즈를 생산할 수 있어 경제적으로 유용하다.

L. starkeyi

ATCC 74054로부터 얻은 텍사메이즈와

L. starkeyi

KSM 22에서 분리한 텍사메이즈는 실질적으로 동일하다.

또한 본 발명은 텍사메이즈를 함유하는 향충치 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 예를 들어 치약, 구강세정제와 같은 구강용 조성물, 캔디, 껌,

음료와 같은 식품 등이다. 본 발명에 따른 효소는 시판되는 구강세정제액에서 장기간 안정되게 활성이 유지될 뿐 아니라, 효소 억제제에 대해 강한 내성을 나타낸다. 따라서 본 발명의 효소는 다양한 구강보호 제품, 예를 들어 치약, 구강세정제 등에 사용될 수 있다. 각 구강용 조성물 또는 식품 조성물의 구체적인 조성은 그것이 속하는 기술분야의 통상의 전문가에 의해 어렵지 않게 결정될 수 있을 것이다.

정의

덱스트라네이즈 활성은 2% 덱스트란을 포함하는 완충액에 효소액을 첨가하여 37℃에서 15분 반응시켜 생성되는 아이소말토오스 양을 측정하여 결정한다. 덱스트라네이즈 1IU는 덱스트란을 기질로 37℃에서 1분 반응시켰을 때 아이소말토오스 1umol을 생성하는 효소량으로 정의된다.

아밀레이즈 활성은 2% 전분을 포함하는 완충액에 효소액을 첨가하여 37℃에서 15분 반응시켜 측정한다

최소염 배지: (NH

```

{
  :
  }
  ?
  SO
  {
  }
  0.5%(w/v); KH
  {
  }
  2O
  {
  }
  0.15%(w/v); MgSO
  {
  }
  7H
  {
  }
  } 0.01%(w/v); NaCl 0.01%(w/v); CaCl
  {
  }
  2H
  {
  }
  } 0.01%(w/v)

```

_W 배지: 효모추출물 0.3%(w/v); KH

```

{
  }
  2O
  {
  }
  0.3%(w/v)

```

글루칸 가수분해율 =

(효소 처리로 생성되는 환원당 $\mu\text{mol/mL}$) - (효소 무처리 시의 환원당 $\mu\text{mol/mL}$)

----- x 100

폴리사카라이드 시료 중 총 글루코오스 μmol

이하 본 발명의 구성과 작용을 당업자가 용이하게 실시할 수 있도록 실시예를 들어 상세히 설명할 것이나 이들 실시예에 의해 본 발명의 범위가 한정되지는 않는다.

실시예 1.

.. starkeyi

ATCC 74054를 0.5% 덱스트란과 0.1% 효모 추출물을 함유하는 최소염배지 1 %에서 28℃에서 4일간 배양한 후 멸균한 100 mmol

인산염 완충액(pH 7.0)에 현탁하였다. 1ml 세포 현탁액에 100 μl 에틸메탄설포네이트(EMS)를 넣고 5분, 10분, 20분간 처리한 후 소듐 티오 설페이트(10%, w.v)를 첨가하였다. 세포를 인산염 완충액으로 2회 씻은 후 2층 아가 플레이트에 깔았다. 2층 아가 플레이트의 상층은 1% 전분, 0.05% 2-디옥시-D-글루코오스, 1.5% 아가를 포함하는 최소염 배지로 구성되며, 하층은 블루덱스트란(0.4% w/v)와 1.5% 아가로 구성된다. 블루 덱스트란의 투명환 형성 정도와 요오드 실험을 통해 덱스트라네이즈와 아밀레이즈 활성이 모두 우수한 균주를 선발하였으며,

.. starkeyi

KSM 22라고 명명하였다.

실시예 2

.. starkeyi

<SM 22을 1% 전분을 함유하는 LW 배지(pH 4.0)를 포함하는 4L 발효조에서, 30℃, 100rpm 조건으로 배양하였다. 70% 암모늄 설페이트 침전에 의해 배양 상등액 3L를 300 mL로 농축시키고, 이것을 멤브레인(cut-off 30 K)을 이용하여 50 mL로 농축하였다. 농축액을 20mM 포타슘 인산염 완충액(pH 6.0)으로 평형시킨 CM-세파로오스 컬럼에 로딩하고 0.5M NaCl를 포함하는 20mM 포타슘 인산염 완충액(pH 6.0)으로 용출시켰다. 덱스트라네이즈 활성과 아밀레이즈 활성을 모두 가지는 분획을 모으고, 아이소프로판올을 첨가하여 농축시켰다. 농축물 3 mL을, 50mM 사이트레이트 인산염 완충액(pH 5.5)로 평형시킨 BIO-RAD A-0.5 컬럼에 로딩하여 겔퍼미에이션 크로마토그래피하여 덱스트라네이즈 활성이 있는 분획을 모았다. SDS- PAGE(10%)하여 덱스트라네이즈와 아밀레이즈 활성을 모두 가지는 94K, 60K 두 밴드를 얻었다.

실시예 3

다음과 같은 pH 2.5~7.5 범위의 50 mM 완충액을 사용하여, 실시예 2에서 얻은 효소의 덱스트라네이즈 활성 및 아밀레이즈 활성의 최적 pH를 결정하였다:

사이트레이트/인산염 완충액(pH 2.5~3.5),

피리딘 아세테이트 완충액(pH 4.0~5.5),

인산염 완충액(pH 6.0~7.5).

결과를 도 1a 및 도 1b에 나타낸다. pH에 따른 덱스트라네이즈 활성 및 아밀레이즈 활성의 안정성은 효소 스타크를 각 pH에서 22℃에서 72 시간 반응시킨 후 측정하였다. 덱스트라네이즈 활성은 pH 2.0~7.5 범위에서 안정하였고, 아밀레이즈 활성은 pH 4.0~6.0에서 안정하였다.

최적 온도를 알아보기 위하여 pH 5.5 완충액에서 각 온도별로 15분 반응시킨 후 덱스트라네이즈 활성 및 아밀레이즈 활성을 측정하였다. 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타낸다. 온도 안정성을 알아보기 위하여 효소 스타크(5 IU)를 pH 5.5 완충액으로 희석한 후 각 온도별로 3분 반응시켜 효소 활성을 측정하였다. 덱스트라네이즈

활성 및 아밀레이즈 활성은 각각 50℃ 및 80℃ 이하에서 초기 활성의 80%를 유지하였다.

실시에 4. 글루칸 가수분해

S. mutans

에서 분리한 글루코실트랜스퍼레이즈를 사용하여 다음과 같이 불용성 글루칸을 제조하였다. 2% 글루코오스를 함유하는 LW 배지(pH. 7.0)에서 *S. mutans*를 37℃로 1일 배양한 후 상등액을 분리하였다. 얻은 상등액 1L를 20mM 인산염 완충액(pH 7.0)에 녹인 200 mM 수크로오스 1L와 혼합하여 24시간 방치한 후 원심분리하여 불용성 물질을 모았다. 물로 3회 세척한 후 아세톤과 에탄올로 씻어 불용성 글루칸을 얻었다. 사이트레이트-인산염 완충액(20mM, pH 5.5)에 불용성 글루칸을 5mg/mL로 현탁시켜 불용성 글루칸 현탁액을 만들었다.

사이트레이트-인산염 완충액(20mM, pH 5.5)에 얻은 수용성 글루칸 T-2000 (pharmacia co. 스웨덴)을 5 mg/ml로 녹여 수용성 글루칸 용액을 만들었다. 각 글루칸 시료 1 mL에 실시에 2에서 얻은 효소 5 IU를 첨가하여 37℃에서 48 시간 반응시킨 후 TLC를 통하여 반응 산물을 확인하였다. 결과를 표 1에 나타낸다.

L. starkeyi

ATCC 74054를 1% 전분과 0.05% 2-디옥시-D-글루코오스를 포함하는 LW 배지 4 L에서 pH 4.0, 30C, 교반속도 1.0 vvm으로 24시간 배양하고, 실시에 2와 같은 방법으로 효소를 분리하였다.

L. starkeyi

ATCC 74054 효소를 사용하여 위 실험을 반복하였다. 결과를 표 1에 나타낸다.

Lipomyces starkeyi

ATCC 74054와 KSM 22에서 생산된 각각의 덱사메이즈는 얻어지는 산물이 거의 동일하였다.

또,

Penicillium funiculosum

이 생산하는 덱스트라네이즈(Sigma)를 사용하여

위 실험을 반복하였다. 결과를 표 1에 나타낸다.

【표 1】

	가수분해율 (%)		생성물 (%)					
			글루코오스	아이소 말토오스	아이소말토 트리오스	분지말토 테트라오스	분지말토 펜타오스	나이케로스
ATCC 77054	수용성 글루칸	65.7	30	31	15	5	3	
	불용성 글루칸	18.9	80					
KSM 22	수용성 글루칸	76.8	30	31	15	5	3	
	불용성 글루칸	19.5	80					
페니실리움	수용성 글루칸	66.7	22	49		7	8	
	불용성 글루칸	5.2	22	20		6		11

실시에 5. 레반 분해 실험

3-플락탄 폴리머인 레반을 사이트레이트-포스페이트 완충액 (20 mM, pH 5.5)에 5 mg/ml로 녹였다. 37℃에서 덱사메이즈 1 IU을 레반 용액 100 μL에 첨가하여 1시간 방치한 후 TLC로 생성물을 확인하였다. 결과를 도 3에 나타낸다. 본 발명에 따른 덱사메이즈는 레반(levan)을 분해할 수 있으므로 플라크 형성 성분인 프락탄(fructan)도 효과적으로 분해할 수 있다.

실시에 6. 글루칸에 의한 세포 응집 억제 실험

글루칸에 의한 세포 응집을 알아보기 위하여 다음과 같이 실험하였다. 0.25% 글루코오스를 함유하는 트리신-가수분해 공분해물 100ml에

S. mutans

를 접종하여 37℃에서 하룻밤 배양하였다. 원심분리하여 세포를 회수하고 5mM Tris 완충액(pH 8.4)로 2회 씻은 후 배지와 동일한 부피의 동일한 완충액에 현탁시켰다. 세포 현탁액 550 μ L와 수용성 글루칸 T2000 50 μ L(5 mM Tris 완충액(pH 8.4)에 15g/ml로 녹인 것)을 혼합하고 덱사메이즈 50 μ L(0.5IU/mL)을 처리하였다. 40℃에서 5분간 방치한 후, 이 혼합액을 A

700

에서 5분 간격으로 60분간으로 흡광도를 측정하였다. 세포와 수용성 글루칸 T2000이 응집됨에 따라 흡광도가 감소되었으며, 덱사메이즈를 첨가하지 않은 대조구에 비해, 덱사메이즈 50 μ L(0.5IU/mL)을 처리하였을 때는 세포와 수용성 덱스트란 T2000의 응집정도가 저해되었다. 그 결과를 도 4에 나타낸다.

실시에 7. 플라크 형성 억제 및 제거 실험

Schachtele C.F, 등의 방법(Infect. Immun, 1975, 12: 309-317) 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다.

배양하여 회수한 세포를 멸균한 탈이온수에 5 % (wet w/v)로 현탁시키는 것을 제외하고는 실시에 5에 기재된 방법에 따라

S. mutans

현탁액을 준비하였다. 유리관에 세포 현탁액 0.2 mL, 1.0 mL 슈크로오스 용액(100 mM 인산염 완충액 (pH 5.8)에 50 mg/ml로 녹인 것), 멸균 탈이온수 4.4 mL과 덱사메이즈 0.4 mL(50 mM 인산염 완충액(pH 5.8))을 넣고 교반없이 37. C에서 16~18 시간 반응시켰다. 덱사메이즈 양은 0~2 IU/mL로 하였다. 반응액과 비부착성 세포를 조심스럽게 제거한 후, 부착성 세포를 20 mM 인산염 완충액(pH 5.8)로 씻고 동일한 완충액 3.0 mL를 첨가하여 현탁시켰다. A

150

에서 탁도를 측정하였다. 결과를 도 5에 나타낸다. 덱사메이즈를 첨가하지 않은 대조구에 비해, 덱사메이즈 0.1 IU/mL을 첨가하였을 때 불용성 글루칸 형성이 80 % 저해되었다(도 5).

기미 형성된 글루칸 막의 제거효과를 알아보기 위하여, 덱사메이즈를 첨가하

지 않는 것을 제외하고는 위의 방법과 동일한 방법에 의해 글루칸 막이 형성된 부착성 물질을 얻었다. 부착성 세포에 덱사메이즈를 0.5 IU/ml 첨가하고 37. C에서 24시간 방치하였다. 반응액과 비부착성 세포를 조심스럽게 제거한 후, A

150

에서 흡광도를 측정하여 부착성 물질의 양을 측정하였다. 덱사메이즈를 첨가하지 않은 대조구에 비해, 부착성 필름의 약 80 %가 분해되었다 (도 6).

실시에 8. 치아에 대한 결합력 실험

덱사메이즈의 치아에 대한 결합력을 알아보기 위하여 다음 실험을 수행하였다. 하이드록시아파타이트(Bio-Gel HTP, Bio-Rad Laboratories)를 10 mM 인산염 완충액(pH 6.8)에 현탁시켜 1.2 x 5 cm 컬럼에 충전시켰다. 각 컬럼에 10 mM KH

20

pH 6.8)에 녹인

2. funiculosum

덱스트라네이즈(Sigma)를 2 mL(10 IU/ml) 로딩하고, 1M NaCl을 함유하는 10mM-0.5M 인산염 완충액(모두 pH 6.8)로 용출시키면서 1 mL씩 분획을 받아 각 분획에서 덱스트라네이즈 활성 및 아밀레이즈 활성을 측정하였다. 덱사메이즈를 사용하여 동일하게 실험하였다.

2. funiculosum

덱스트라네이즈는 최소한 2개의 피크를 나타내었으며, 이 두 형태의 덱스트라네이즈 모두 하이드록시아파타이트에 결합하지 않거나 25 mM 인산염 완충액에 의해 용출되었다. 이에 비해 덱사메이즈는 덱스트라네이즈 활성은 50, 125, 225 mM 인산염 완충액에 의해 용출되었고 아밀레이즈 활성은 125, 225, 355 mM 인산염 완충액에 의해 용출되었다. 이것으로부터,

2. funiculosum

덱스트라네이즈에 비해 덱사메이즈가 치아에 대한 결합력이 높을 것임을 추측할 수 있다.

하이드록시아파타이트 대신 타액으로 코팅된 하이드록시아파타이트를 사용하여 본 발명의 덱사메이즈를 로딩하여 동일하게 실험하였다. 타액으로 코팅된 하이드록시아파타이트는 다음과 같이 준비하였다. 즉, 20대의 남성과 여성으로부터 타액을 모아 원심분리하여 맑게 준비한 후, 여과지(Whatman, 0.2 μ m)를 이용하여 여과시켜 타액을 얻었다. 준비된 타액 1 ml에 하이드록시아파타이트 1g을 혼합하여 1시간 둔 후 원심분리하여 상등액을 제거한 후 인산완충액으로 1회 씻어 타액으로 코팅된 하이드록시아파타이트를 얻었다. 덱사메이즈 활성은 200~300 mM 인산염 완충액에 의해 용출되었다.

실시에 9. 플라크 형성 억제 및 제거 실험 (구강세정제와 함께 사용)

서판되는 구강세정제 제품 A(존슨 앤 존슨)에 실시예 2에서 얻은 덱사메이즈를 5IU/ml 첨가하였다. 유리관에 실시예 4와 같은 방법으로 얻은

S. mutans

현탁액 0.2 mL, 1.0 mL, 슈크로오스 용액(100 mM 인산염 완충액 (pH 5.8)에 50 mg/ml로 녹인 것), 멸균 탈이온수 4.4 mL와 덱사메이즈 0.4 mL(5 IU/mL)을 넣고 교반없이 37 °C에서 16~18 시간 반응시켰다. 반응액과 비부착성 세포를 조심스럽게 제거한 후, 부착성 세포를 20 mM 인산염 완충액(pH 5.8)로 씻고 동일한 완충액 6.0 mL에 현탁시켰다. A

550

에서 탁도를 측정하였다. 덱사메이즈를 첨가하지 않은 구강세정제를 첨가한 대조구에 비해, 덱사메이즈를 첨가한 구강세정제를 첨가하였을 때 불용성 글루칸 형성이 80% 저해되었다. 결과를 도 7에 나타낸다 (1: 슈크로오스 +

S. mutans

현탁액 0.2 mL, 2: 슈크로오스 +

S. mutans

현탁액 + 구강세정제, 3: 슈크로오스 +

S. mutans

+ 덱사메이즈, 구강세정제).

이미 형성된 글루칸 막의 제거효과를 알아보기 위하여, 덱사메이즈를 첨가하지 않는 것을 제외하고는 위의 방법과 동일한 방법에 의해 글루칸 막이 형성된 부착성 세포를 얻었다. 부착성 세포에, 덱사메이즈를 첨가한 구강세정제 1 ml(5 IU/ml)을 첨가하여 37 °C에서 24시간 방치하였다. 반응액과 비부착성 세포를 조심스럽게 제거한 후 A

350

에서 흡광도를 측정하여 부착성 물질의 양을 측정하였다. 덱사메이즈를 첨가하지 않은 구강세정제 제품 A를 첨가한 대조구에 비해, 부착성 필름의 약 80 %가 분해되었다. 결과를 도 8에 나타낸다.

실시예 10. 안정성 실험

구강세정제를 구성하는 화합물에 의한 덱사메이즈의 덱스트라네이즈 활성과 아밀레이즈 억제제를 알아보기 위하여, 표 2에 기재된 효소 억제제 또는 구강세정제에 사용되는 화합물에서 효소 활성을 측정하였다. 각 화합물 용액 1 ml에 덱사메이즈 5 IU를 첨가하여 37 °C에서 5분 반응시킨 후 여기에 2% 덱스트란 또는 전분을 동일한 부피로 첨가하여 반응시켰다. 구리-바이신코니네이트(copper- bicinchoninate) 환원법(Jeffrey C. Fox et al., Analytical Biochemistry 195, 93-96 (1991))에 따라 효소 활성을 측정하였다. 결과를 표 2에 나타낸다. 다양한 구강세정제 성분 및 현재 치주질환 치료제로 주로 사용되고 있는 클로로헥시딘(chlorohexidine)에 의해서도 효소 활성이 저해되지 않았다.

【표 2】

저해제	농도	상대활성(%)	
		Lipomyces starkevi KSM 22	
		덱스트라네이즈	아밀레이즈
대조구		100	100
EDTA	10 mM	100	100
SDS	0.05 %	91	92
	0.5 %	85	68
불소	0.05 %	94	91
에탄올	1 %	99	100
	5 %	98	98
	10 %	98	97
	20 %	97	97
소듐벤조에이트	1 %	100	100
프로필 글라이콜	1 %	100	100
클로로헥시딘	0.01 %	98	98
	0.02 %	98	97
	0.05 %	97	97
	0.1 %	93	96
세틸피리디늄 클로라이드	0.001 %	100	100
	0.01 %	99	95
	0.05 %	94	87
	0.1 %	88	80
	0.5 %	71	62
	1 %	67	56

실시에 11

시판되는 구강세정제 4 종류에 실시예 2에서 제조된 텍사메이즈를 10 mg/mL 첨가하여 구강세정제에서의 6개월에 걸쳐 효소 안정성을 관찰하였다. 결과를 도 8에 나타낸다. (A: 존슨 앤 존슨, B: 한미제약, C: 동아제약, D: 일동제약). 6개월 이후, 4개 제품에서 텍스트라네이즈 활성 및 아밀레이즈 활성 모두 처음 활성의 약 93% 이상 유지되었다 (■: 텍사메이즈 활성, □: 아밀레이즈 활성). 또한 A 구강제 및 B 구강제에서 10개월 후 처음 활성의 약 90% 이상이 유지되었고, 22개월 후 처음 활성의 약 73% 이상 유지되었다.

발명의 효과

본 발명에 의해 아밀레이즈 활성과 텍스트라네이즈 활성을 가지는 새로운 효소를 제공할 수 있으며, 이를 이용하여 항플라그 효과 및 항충치가 뛰어난 구강용 조성물을 제공할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

항플라그성 및 항충치성이 있으며, SDS-PAGE로 측정한 분자량이 94K이고, 텍스트라네이즈 활성과 아밀레이즈 활성을 동시에 가지며 불용성 글루칸을 분해하는 효소.

청구항 2.

항플라그성 및 항충치성이 있으며, SDS-PAGE로 측정한 분자량이 60K이고, 텍스트라네이즈 활성과 아밀레이즈 활성을 동시에 가지며 불용성 글루칸을 분해하는 효소.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 효소가

.. starkeyi

<SM 22 또는

.. starkeyi

ATCC 74054로부터 분리된 효소.

청구항 4.

제1항에 기재된 효소를 생산하는

.. starkeyi

KSM 22(기탁번호 KFCC-11077).

청구항 5.

.. starkeyi

ATCC 74054 또는

.. starkeyi

<SM 22를 배양하여 배양액으로부터 텍사메이즈를 회수하는 것으로 이루어지는, 텍사메이즈 제조방법.

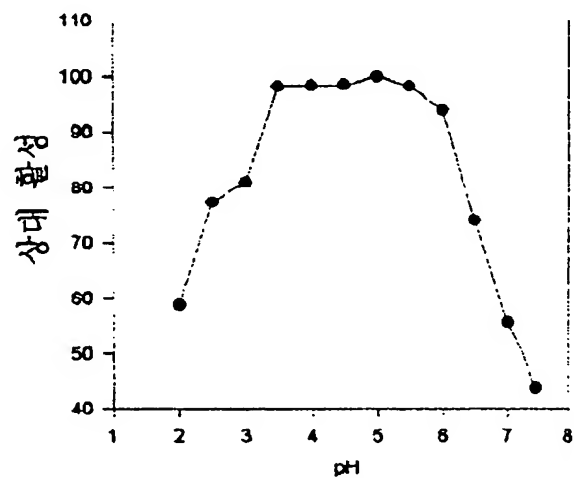
청구항 6.

항플라그성 및 항충치성이 있으며, SDS-PAGE로 측정한 분자량이 94K이고, 텍스트라네이즈 활성과 아밀레이즈 활성을 동시에 가지며 불용성 글루칸을 분해하는

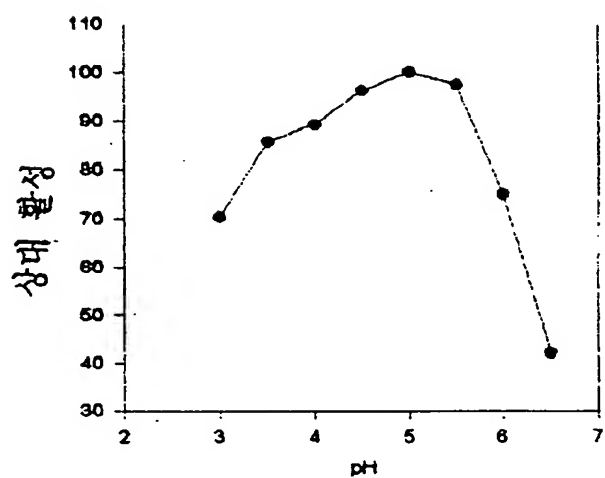
효소 및 항플라그성 및 항충치성이 있으며, SDS-PAGE로 측정한 분자량이 60K이고, 텍스트라네이즈 활성과 아밀레이즈 활성을 동시에 가지며 불용성 글루칸을 분해하는 효소로 구성되는 군에서 선택되는 효소 하나 이상을 함유하는 구강용 조성물.

도면

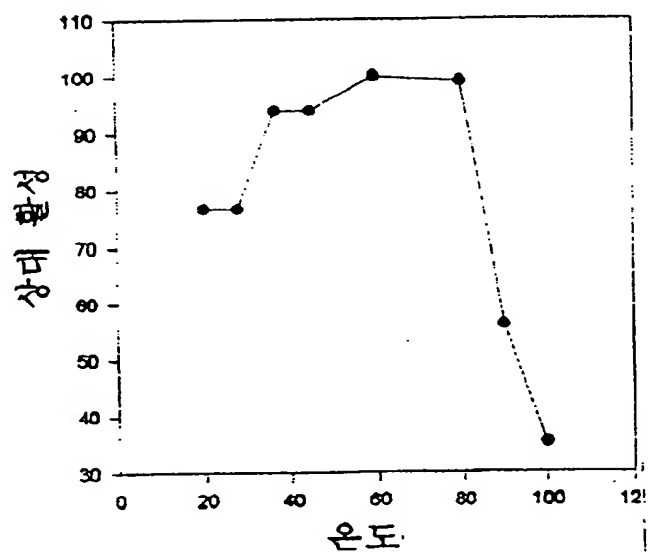
도면 1a



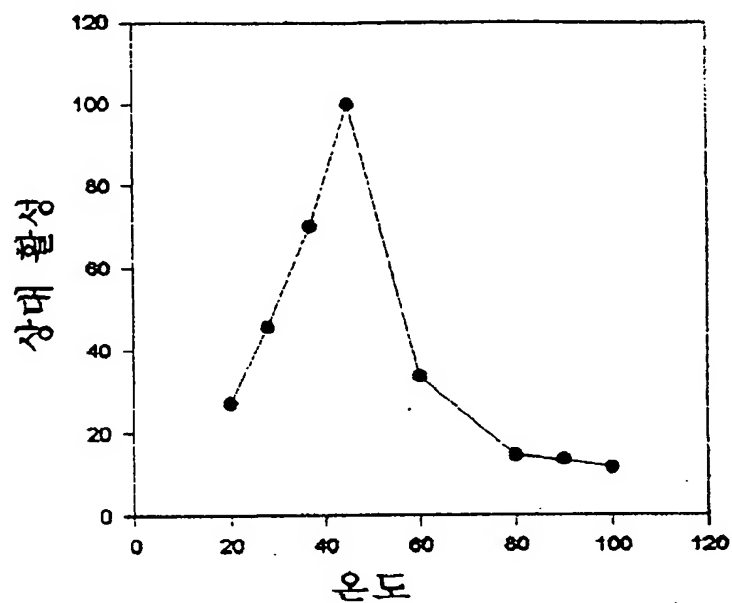
도면 1b



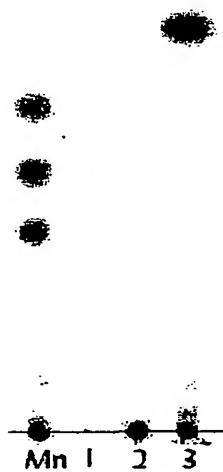
도면 2a



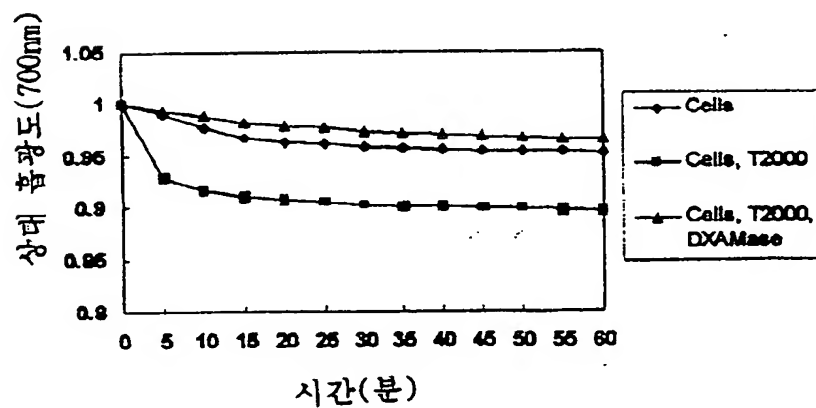
도면 2b



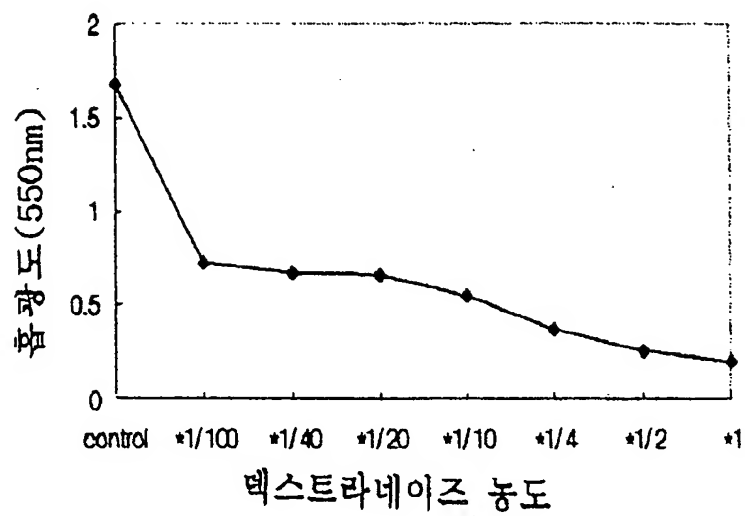
도면 3



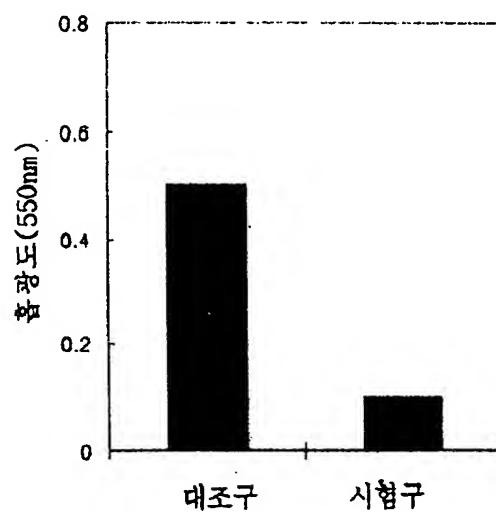
도면 4



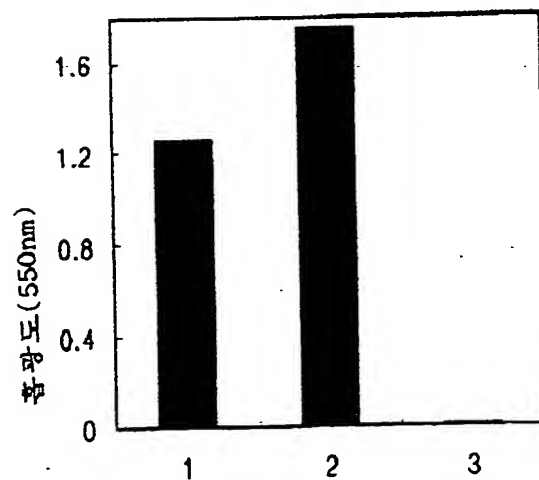
도면 5



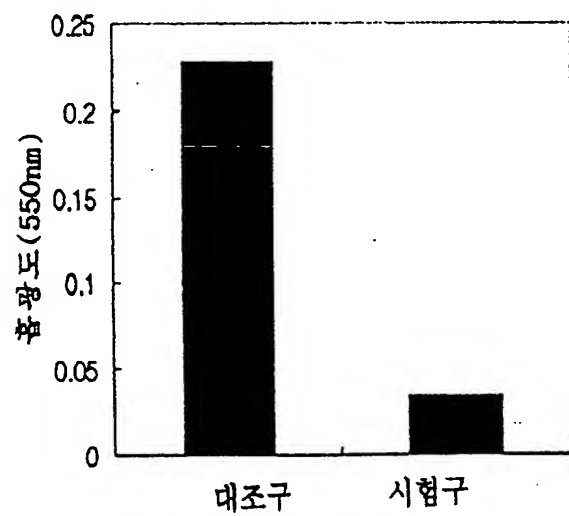
도면 6



도면 7



도면 8



도면 9

